

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**ÜBER DEN EINFLUSS VON HERZWIRKSAMEN GLYKOSIDEN
UND EINEM BISGUANYLHYDRAZON AUF DIE WECHSELWIRKUNG
VON CALCIUMIONEN MIT RIBONUKLEINSÄURE**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz,

den Medizinischen Fachbereichen vorgelegt von

PETER ROSE
aus Bad Polzin

Mainz 1975

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

ÜBER DEN EINFLUSS VON HERZWIRKSAMEN GLYKOSIDEN
UND EINEM BISGUANYLHYDRAZON AUF DIE WECHSELWIRKUNG
VON CALCIUMIONEN MIT RIBONUKLEINSÄURE



Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen vorgelegt von

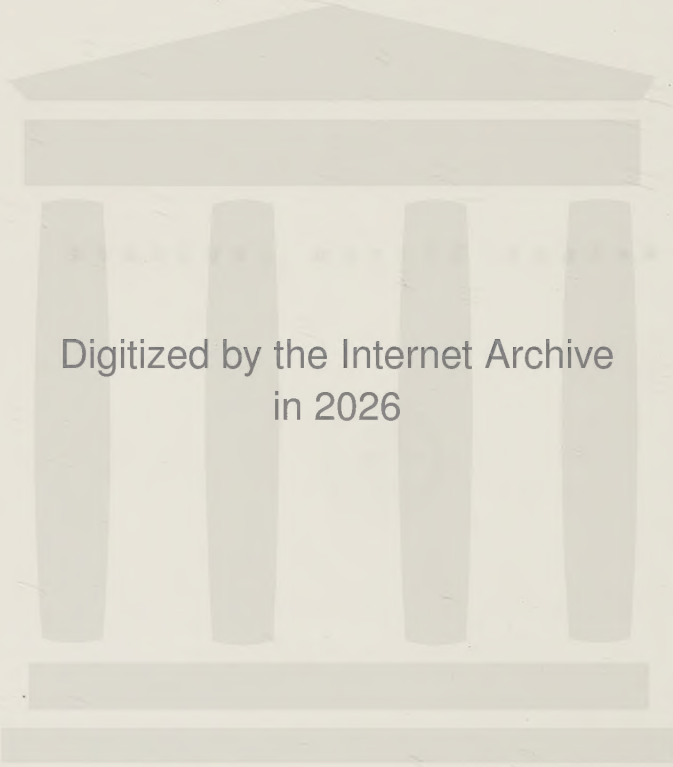
PETER ROSE
aus Bad Polzin

M a i n z 1975



Meinen Eltern gewidmet

Vorstandsmitglied: Prof. Dr. F. H. H. H.
Sekretär: Prof. Dr. F. H. H. H.
Korrespondenz: Prof. Dr. F. H. H. H.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Nachweise	2
1. Aussagen, die auf Ihre Nachweise mit Hinweisen auf die Nachweise hinweisen	2
2. Verweise der Nachweise auf die Nachweise	2
3. Bestimmung der Nachweise und Nachweise	2
4. Nachweise der Nachweise	2
5. Nachweise der Nachweise	2
6. Nachweise der Nachweise	2
7. Nachweise der Nachweise	2
8. Nachweise der Nachweise	2
9. Nachweise der Nachweise	2
10. Nachweise der Nachweise	2
III. Zusammenfassung	2
1. Zusammenfassung der Nachweise	2
2. Zusammenfassung der Nachweise	2
3. Zusammenfassung der Nachweise	2
4. Zusammenfassung der Nachweise	2
5. Zusammenfassung der Nachweise	2
6. Zusammenfassung der Nachweise	2
7. Zusammenfassung der Nachweise	2
8. Zusammenfassung der Nachweise	2
9. Zusammenfassung der Nachweise	2
10. Zusammenfassung der Nachweise	2
11. Zusammenfassung der Nachweise	2
12. Zusammenfassung der Nachweise	2
13. Zusammenfassung der Nachweise	2
14. Zusammenfassung der Nachweise	2
15. Zusammenfassung der Nachweise	2
16. Zusammenfassung der Nachweise	2
17. Zusammenfassung der Nachweise	2
18. Zusammenfassung der Nachweise	2
19. Zusammenfassung der Nachweise	2
20. Zusammenfassung der Nachweise	2
21. Zusammenfassung der Nachweise	2
22. Zusammenfassung der Nachweise	2
23. Zusammenfassung der Nachweise	2
24. Zusammenfassung der Nachweise	2
25. Zusammenfassung der Nachweise	2
26. Zusammenfassung der Nachweise	2
27. Zusammenfassung der Nachweise	2
28. Zusammenfassung der Nachweise	2
29. Zusammenfassung der Nachweise	2
30. Zusammenfassung der Nachweise	2
31. Zusammenfassung der Nachweise	2
32. Zusammenfassung der Nachweise	2
33. Zusammenfassung der Nachweise	2
34. Zusammenfassung der Nachweise	2
35. Zusammenfassung der Nachweise	2
36. Zusammenfassung der Nachweise	2
37. Zusammenfassung der Nachweise	2
38. Zusammenfassung der Nachweise	2
39. Zusammenfassung der Nachweise	2
40. Zusammenfassung der Nachweise	2
41. Zusammenfassung der Nachweise	2
42. Zusammenfassung der Nachweise	2
43. Zusammenfassung der Nachweise	2
44. Zusammenfassung der Nachweise	2
45. Zusammenfassung der Nachweise	2
46. Zusammenfassung der Nachweise	2
47. Zusammenfassung der Nachweise	2
48. Zusammenfassung der Nachweise	2
49. Zusammenfassung der Nachweise	2
50. Zusammenfassung der Nachweise	2
51. Zusammenfassung der Nachweise	2
52. Zusammenfassung der Nachweise	2
53. Zusammenfassung der Nachweise	2
54. Zusammenfassung der Nachweise	2
55. Zusammenfassung der Nachweise	2
56. Zusammenfassung der Nachweise	2
57. Zusammenfassung der Nachweise	2
58. Zusammenfassung der Nachweise	2
59. Zusammenfassung der Nachweise	2
60. Zusammenfassung der Nachweise	2
61. Zusammenfassung der Nachweise	2
62. Zusammenfassung der Nachweise	2
63. Zusammenfassung der Nachweise	2
64. Zusammenfassung der Nachweise	2
65. Zusammenfassung der Nachweise	2
66. Zusammenfassung der Nachweise	2
67. Zusammenfassung der Nachweise	2
68. Zusammenfassung der Nachweise	2
69. Zusammenfassung der Nachweise	2
70. Zusammenfassung der Nachweise	2
71. Zusammenfassung der Nachweise	2
72. Zusammenfassung der Nachweise	2
73. Zusammenfassung der Nachweise	2
74. Zusammenfassung der Nachweise	2
75. Zusammenfassung der Nachweise	2
76. Zusammenfassung der Nachweise	2
77. Zusammenfassung der Nachweise	2
78. Zusammenfassung der Nachweise	2
79. Zusammenfassung der Nachweise	2
80. Zusammenfassung der Nachweise	2
81. Zusammenfassung der Nachweise	2
82. Zusammenfassung der Nachweise	2
83. Zusammenfassung der Nachweise	2
84. Zusammenfassung der Nachweise	2
85. Zusammenfassung der Nachweise	2
86. Zusammenfassung der Nachweise	2
87. Zusammenfassung der Nachweise	2
88. Zusammenfassung der Nachweise	2
89. Zusammenfassung der Nachweise	2
90. Zusammenfassung der Nachweise	2
91. Zusammenfassung der Nachweise	2
92. Zusammenfassung der Nachweise	2
93. Zusammenfassung der Nachweise	2
94. Zusammenfassung der Nachweise	2
95. Zusammenfassung der Nachweise	2
96. Zusammenfassung der Nachweise	2
97. Zusammenfassung der Nachweise	2
98. Zusammenfassung der Nachweise	2
99. Zusammenfassung der Nachweise	2
100. Zusammenfassung der Nachweise	2

Fachbereichsdekan: Prof.Dr.P.Klein
Referent: Prof.Dr.U.Wollert
Korreferent: Prof.Dr.Dr.J.Krieglstein

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I Einleitung	1
II Methodik	2
1. Substanzen, die auf ihre Wechselwirkung mit Ribonukleinsäure untersucht wurden.	2
2. Vordialyse der Ribonukleinsäure	2
3. Bestimmung der Bestandteile und Charakterisierung der Lösung.	3
4. Charakterisierung der Substanz-RNS-Lösung	3
5. Substanz-Stammlösungen	3
6. Quantitative Bestimmung der Wechselwirkung	4
7. Bestimmung der Calciumkonzentration	5
8. Einfluß von g-Strophanthin, Digitoxin, Digitoxigenin und BG 32 auf die Wechselwirkung von Calciumionen mit Ribonukleinsäure	6
9. Charakterisierung der Wechselwirkung von Calciumionen mit Ribonukleinsäure	6
10. Statistische Methoden	8
III Versuchsergebnisse	11
1. Der prozentuale Anteil α an freier Substanz bei Gleichgewichtsdialyse	11
a) Calciumionen und RNS	11
b) Einfluß von g-Strophanthin auf die Bindung von Calciumionen an RNS	12
c) Einfluß von Digitoxin auf die Bindung von Calciumionen an RNS	12

- d) Einfluß von Digitoxigenin auf die Bindung
von Calciumionen an RNS 12
- e) Einfluß von BG 32 auf die Bindung von
Calciumionen an RNS 13

2. Weitere Charakterisierung der Bindung von
Calciumionen an RNS 22

IV Diskussion 40

V Zusammenfassung 45

VI Literaturverzeichnis 46

I Einleitung

Bisguanylhydrazone mit cardiotoner Wirkung sind zuerst von Kroneberg und Stoepel (1964) sowie Kroneberg et al. (1964) beschrieben worden. Sie ähneln in ihrem Verhalten weitgehend den Herzglykosiden, so sind sie positiv inotrop wirksam, verändern nach toxischen Konzentrationen den Erregungsablauf an der isolierten Vorhofmuskulatur des Meerschweinchenherzens und erhöhen die Fraktion des austauschbaren Calciums (Wollert, 1969).

Im Herzmuskel des Meerschweinchens besitzen einige Bisguanylhydrazone eine lange Verweildauer und werden dort in der mikrosomalen Fraktion angereichert (Hofmann und Wollert, 1969 a,b). Herzglykoside sind nicht so lange im Herzen nachweisbar (Repke, 1958; Harrison et al., 1966), werden jedoch in den Mikrosomen auch angereichert (Dutta et al., 1968; Gerber et al., 1968). Riechert und Wollert (1971) konnten nachweisen, daß Bisguanylhydrazone stark an Ribonukleinsäure gebunden werden. Für die Anreicherung der Herzglykoside in der mikrosomalen Fraktion des Herzmuskels spielt die Ribonukleinsäure wahrscheinlich keine Rolle (Franke, 1971).

Wie verschiedene Autoren (Repke, 1964; Klaus und Lüllmann, 1964; Lee et al., 1966; Dransfeld et al., 1967; Klaus und Lee, 1969) zeigen konnten, geht mit der Wirkung von Herzglykosiden eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration im Herzmuskel einher, an der die Mikrosomenfraktion beteiligt sein könnte (Chipperfield und Nayler, 1969).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Wechselwirkung zwischen Calciumionen und Ribonukleinsäure durch Herzglykoside bzw. herzglykosidartig wirkende Substanzen beeinflusst werden kann.

II. Methodik

1. Substanzen, die auf ihre Wechselwirkung mit Ribonukleinsäure untersucht wurden.

Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a., Firma Merck Darmstadt, Nr. 2382) wurde auf seine Wechselwirkung mit aus Hefe gewonnener Ribonukleinsäure (Firma Boehringer Mannheim, Nr. 15332) geprüft. Außerdem wurde der Einfluß folgender Substanzen auf die Bindung von Calciumchlorid an Ribonukleinsäure untersucht:
g-Strophanthin, Digitoxin, Digitoxigenin,^{+) Dodecandion-2,11-bisguanylhydrazondinitrat, das BG 32 genannt wird und im Pharmazeutischen Institut der Universität Mainz synthetisiert wurde.}

2. Vordialyse der Ribonukleinsäure.

1,8 g Hefe-RNS wurden für die Vordialyse in 100 ml 0,2 M Trispufferlösung (Trishydroxymethylaminomethan p.a., Firma Merck Darmstadt, Nr. 8382) vom pH 7,40 gelöst. Der pH-Wert wurde anschließend überprüft und potentiometrisch mit 1 n Natronlauge und 1 n Salzsäure auf pH 7,40 eingestellt. Die RNS-Lösung wurde in Visking-Dialysierschläuche (Visking-Dialysierschlauch, Firma Serva Heidelberg, Nr. 44110, 15-20 Å) gefüllt und 4 Tage gegen jeweils 2 Liter 0,2 M Trispuffer vom pH 7,40, der täglich erneuert wurde, dialysiert (Riechert und Wollert, 1971 a). Insgesamt wurden die 100 ml RNS-Lösung also gegen 8 Liter 0,2 M Trispufferlösung dialysiert. Die Temperatur betrug ständig $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Die vordialysierte RNS wurde nicht länger als 4 Tage verwendet. Durch die Vordialyse enthielt die RNS-Lösung praktisch keine niedermolekularen Bestandteile mehr,

^{+) Die Substanzen wurden freundlicherweise von der Firma Boehringer Mannheim zur Verfügung gestellt.}

so daß eine für die Dialyseversuche brauchbare hochmolekulare RNS enthaltende Lösung vorlag.

3. Bestimmung der Bestandteile und Charakterisierung der Lösung.

Die Konzentration der vordialysierten RNS wurde mit Hilfe der Orcinmethode nach Lin und Schjeide (1969) bestimmt. Die Messungen wurden am Micro-Sample-Spectrophotometer 300-N (Firma Gilford) bei einer Wellenlänge von 666 nm durchgeführt.

Die vordialysierte RNS wurde mit 0,2 M Trispufferlösung vom pH 7,40 auf einen Gehalt von 0,5 % verdünnt und der pH-Wert, wie unter 2. angegeben, kontrolliert. Nur diese 0,5%ige RNS wurde für die Dialyseversuche verwendet.

4. Charakterisierung der Substanz-RNS-Lösungen.

Zuerst wurde festgestellt, inwieweit Calciumchlorid in den Konzentrationen $5 \cdot 10^{-5}$ M, 10^{-4} M, $5 \cdot 10^{-4}$ M und 10^{-3} an RNS gebunden wird. Weiterhin wurde die Bindung der Calciumionen an RNS unter dem Einfluß folgender Substanzen, jeweils in den Konzentrationen 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M und 10^{-4} M untersucht:

g-Strophanthin, Digitoxin, Digitoxigenin, BG 32.

5. Substanz-Stammlösungen.

Die für die Dialyse benötigten Mengen der Substanzen wurden aus folgenden Stammlösungen, die in Plastikflaschen mit Schraubverschluß aufbewahrt wurden, gewonnen.

- a) Calciumchlorid: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a., Molekulargewicht von 147,02, wurde als eine $5 \cdot 10^{-2}$ M Lösung in Aqua bidest angesetzt. Daraus wurden die unter 4. angegebenen Konzentrationen gewonnen.

- b) BG 32; Molekulargewicht von 436,5; es wurde eine wäßrige Stammlösung durch leichtes Erwärmen hergestellt, Molarität $2 \cdot 10^{-3}$ M. Aus ihr wurden Lösungen der Konzentration 10^{-5} M und 10^{-4} M angesetzt und eine $2 \cdot 10^{-5}$ M Lösung gewonnen, die dazu diente, Lösungen der Konzentrationen 10^{-7} M und 10^{-6} M anzusetzen.
- c) g-Strophanthin; Digitoxin; Digitoxigenin; Molekulargewichte von 728,77; 764,92; 374,50; die Stammlösung von $2 \cdot 10^{-3}$ M wurde in einer Lösung aus 5 ml Aqua bidest und 10 ml Äthanol (p.a. Äthanol absolut, Firma Merck Darmstadt) hergestellt. Die erforderlichen Konzentrationen wurden daraus, wie unter b) angegeben, gewonnen.

Wie Kontrollversuche zeigten, hatte in entsprechenden Verdünnungen Äthylalkohol keinen Einfluß auf die Wechselwirkung von Calciumionen mit Ribonukleinsäure.

6. Quantitative Bestimmung der Wechselwirkung.

Die Wechselwirkung von Calciumionen mit Ribonukleinsäure wurde mit der Dialysemethode (Krieglstein und Kuschinsky, 1968; Riechert und Wollert, 1971a) bestimmt.

Die Substanz-RNS-Lösungen wurden zu 5 ml in Visking-Dialysierschläuche (Firma Serva Heidelberg, Nr. 44104, 15-20 Å) von 7 mm lichter Weite gefüllt und in Glasröhrchen von 8 mm Durchmesser 16 Stunden lang bei Zimmertemperatur maschinell auf- und abbewegt. Die Glasröhrchen enthielten 5 ml 0,2 M Trispuffer vom pH 7,40.

Nach der Dialyse wurde der Calciumgehalt der RNS-haltigen Lösung in den Dialysesäckchen und derjenige in der Pufferlösung bestimmt.

7. Bestimmung der Calciumkonzentration.

Von den nach Beendigung der Dialyse erhaltenen Proben wurden aus der Pufferlösung je 3 x 1,0 ml und aus der Lösung der Dialysesäckchen je 3 x 0,5 ml entnommen. Diese Proben wurden in einem elektrisch beheizten Aluminiumblock bei 80° C eingedampft. Der Rückstand wurde mit 0,2 ml Veraschungsgemisch, bestehend aus gleichen Teilen Perchlorsäure (p.a., etwa 70%ig, Firma Merck Darmstadt, Nr. 519) und Salpetersäure (p.a., mindestens 65%ig, Firma Merck Darmstadt, Nr. 454), nach der Methode von Hattingberg et al. (1966) nass verascht. Die veraschten Proben wurden in 1 ml n/10 HCl aufgelöst und mit 1,5 ml 1%iger Lanthanchloridlösung versetzt.

Für die Messung wurde eine Eichkurve im Konzentrationsbereich von 0,05 bis 0,5 M CaCl_2 /ml aus einer 5 M Calciumchloridlösung hergestellt. Die Eichkurvenproben wurden auf 2,5 ml mit 1%iger Lanthanchloridlösung aufgefüllt.

Die Proben der Substanz-RNS- Ca^{++} -Lösung, als Standard eingesetzt, wurden wie die Proben aus den Dialysesäckchen behandelt. Mit den Leerwerten, 0,2 M Trispufferlösung, wurde, wie oben angegeben, verfahren.

In diesen vorbehandelten Proben wurde der Calciumgehalt mittels eines Atom-Absorptionsspektrophotometers 403 (Firma Perkin Elmer) bestimmt. Es wurde die Extinktion für Calcium bei einer Wellenlänge von 422,67 μm gemessen.

Die Durchflußmenge betrug bei allen Versuchen 2 ml für einen Zeitraum von 3 Messungen bei 100 averages.

In der Substanz-RNS- Ca^{++} -Lösung wurde die Gesamtkonzentration an Calcium ermittelt. Die Proben wurden entsprechend der obigen Methode behandelt.

Tabelle 1 und Abb. 1 veranschaulichen die Zusammensetzung der Calciumgesamtkonzentration der Ca^{++} -RNS-Lösungen.

8. Einfluß von g-Strophanthin, Digitoxin, Digitoxigenin und BG 32 auf die Wechselwirkung von Calciumionen mit Ribonukleinsäure.

Die Ca^{++} -RNS-Lösung wurde in mehreren Versuchsreihen mit g-Strophanthin, Digitoxin, Digitoxigenin und BG 32 in steigenden Konzentrationen von 10^{-7} M bis 10^{-4} M versetzt. Der Einfluß, den diese Substanzen auf die Wechselwirkung zwischen Calciumionen und Ribonukleinsäure nehmen, wurde bestimmt.

9. Charakterisierung der Wechselwirkung von Calciumionen mit Ribonukleinsäure.

Um die Wechselwirkungen von Calciumionen mit Ribonukleinsäure zu beschreiben, wurden der prozentuale Anteil α an freien Calciumionen (Scholtan und Schmid, 1962) sowie die apparente Bindungskonstante k^+ und die Steigungskonstante m (Scholtan, 1963) bestimmt.

Weiter wurden zur Charakterisierung der Wechselwirkung die Konstanten K , K_1 und die Anzahl n der Bindungsstellen herangezogen. Diese Größen wurden für ein angenommenes Molekulargewicht der Hefe-RNS von 100 000 bzw. 500 000 berechnet (Riechert und Wollert, 1971 a).

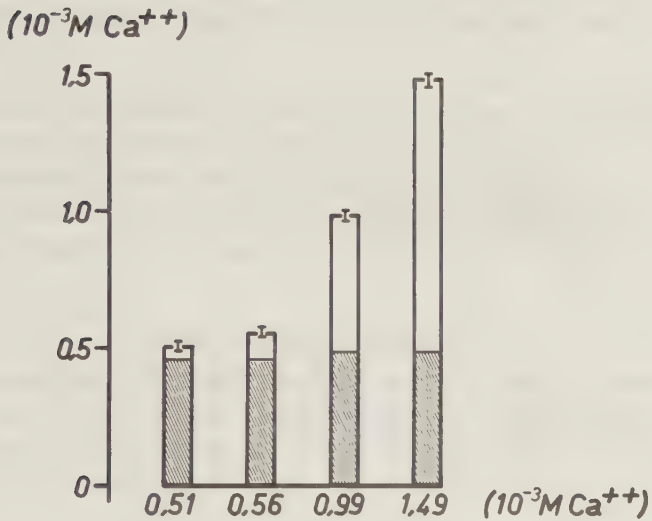


Abb. 1: Die Säulen zeigen die bestimmte Gesamtcalciumkonzentration (10^{-3} M) auf der Ordinate.

Schraffierter Teil der Säulen:

die in einer 0,5%igen Hefe-RNS-Lösung vorhandene molare Ca^{++} -Konzentration.

Weißer Teil der Säulen:

zugesezte molare Calciumkonzentration

Die Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 29 - 31$ Versuchen dar.

10. Statistische Methoden.

Für jede Versuchsreihe wurden die Mittelwerte $\bar{x}$ der Proben, der Standardfehler des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$ und die Standardabweichung s berechnet. Sie ergeben sich aus folgenden Formeln:

$$(1) \quad \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad n = \text{Anzahl der Versuche}$$

$$(2) \quad s = \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n-1} - \frac{1}{n} (\sum x_i)^2}$$

$$(3) \quad s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Eine einfache Varianzanalyse wird gerechnet, um zu prüfen, ob sich die Mittelwerte des freien Ca^{++} -Anteils (α -Wert) zwischen den Gruppen (Versuchsbedingungen) insgesamt gesehen mehr als rein zufällig unterscheiden. Der Test nach Dunnett (Miller, 1966) wird anschließend durchgeführt, um zu unterscheiden, welche Versuchsbedingungen einen gegenüber der Kontrollgruppe erhöhten freien Anteil an Calciumionen aufweisen. Zur Beurteilung der statistischen Zahlen wurden die neuen graphischen Tafeln von Koller (1969) benutzt. Zur Darstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung werden nach Logarithmierung der Konzentrationen und Wirkungen lineare Regressionen gerechnet. Gleichzeitig wird geprüft, ob sich die Steigung der einzelnen Wirkungsgeraden mehr als rein zufällig unterscheiden.

Bei der Berechnung der apparenten Bindungskonstanten k^+ , der Gesamtbindungskonstanten K_1 und einer, der Gesamtbindungskonstanten proportionalen Größe K wurden die Mittelwerte des freien Anteils der Calciumionen (α -Wert) herangezogen. Die Werte für die Größen K und K_1 werden in Tab. 5 aufgeführt, die Mittelwerte des freien Anteils der Calciumionen finden sich in Tab. 6 b.

Die einfache Varianzanalyse wurde für die eigenen Versuchsgruppen und die von Martynus (1973) gemeinsam berechnet, da die Versuche in Zusammenarbeit durchgeführt wurden und eine gemeinsame Kontrollgruppe- Ca^{++} - als Bezugsgröße benutzt wurde. Die Beurteilung der Ergebnisse bei dem Test nach Dunnett erfolgte wie nachstehend:

a) Übersteigt oder erreicht der berechnete Prüfwert den für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % tabellierten Grenzwert $G_{5\%}$, nicht, so ist der betrachtete Mittelwertsunterschied zwischen dem Mittelwert und der Kontrolle als vermutlich zufallsbedingt und sachlich nicht vorhanden anzusehen.

$(p > 5 \% = \text{kein Unterschied vorhanden})$

b) Erreicht oder übersteigt der Prüfwert die Grenzen von $G_{5\%}$, aber nicht die Grenzen von $G_{1\%}$, so soll er als auffällig = + angesehen werden.

$(1 \% < p < 5 \% = \text{statistisch auffällig})^+$

c) Wird die Grenze von $G_{1\%}$ erreicht oder überschritten, so nennt man den Unterschied "statistisch signifikant" = ++ oder "statistisch gesichert" = ++.

$(p < 1 \% = \text{statistisch signifikant})^{++}$

Tabelle 1: Calciumgesamtkonzentration der verwendeten Ca^{++} -RNS-Lösungen.
Die Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = (29-31)$ Versuchen dar.

Calcium-RNS-Lösung	Calciumgehalt einer 0,5%igen RNS-Lösung (10^{-3} M)	Calciumgesamtkonzentration = c der Ca^{++} -RNS-Lösungen (10^{-3} M)
10^{-3} M $\text{Ca}^{++} + 0,5 \%$ RNS-Lsg.	0,49	$1,49 \pm 0,03$ (N = 29)
$5 \cdot 10^{-4}$ M $\text{Ca}^{++} + 0,5 \%$ RNS-Lsg.	0,49	$0,99 \pm 0,02$ (N = 31)
10^{-4} M $\text{Ca}^{++} + 0,5 \%$ RNS-Lsg.	0,46	$0,56 \pm 0,02$ (N = 31)
$5 \cdot 10^{-5}$ M $\text{Ca}^{++} + 0,5 \%$ RNS-Lsg.	0,46	$0,51 \pm 0,02$ (N = 31)

III Versuchsergebnisse

1. Der prozentuale Anteil α an freier Substanz bei Gleichgewichtsdialyse.

a) Calciumionen und RNS

Es wurde der Einfluß, den die Calciumgesamtkonzentration auf den Anteil α an freien Calciumionen bei Gleichgewichtsdialyse ausübt, bestimmt (Tab. 2).

Der nicht an Ribonukleinsäure gebundene Anteil der Calciumionen nimmt in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 10 ‰ auf 14 ‰ bei ansteigender Calciumionenkonzentration zu.

Tab. 2: Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen von der Calciumgesamtkonzentration c und 0,5%ige RNS-Lösung (pH 7,40)
Zimmertemperatur (22°C)
16 Stunden Dialyse

$\text{Ca}^{++} \cdot (10^{-3} \text{ M}) = c$ Calciumionenkonzentration	Anzahl der Versuche	Anteil für Calciumionen α (%)
0,51	23	$10,02 \pm 0,15$
0,56	23	$10,47 \pm 0,24$
0,99	23	$11,84 \pm 0,32$
1,49	21	$14,27 \pm 0,72$

b) Einfluß von g-Strophanthin auf die Bindung von Calciumionen an RNS (Abb. 2)

In dem untersuchten Konzentrationsbereich ($0,51 \cdot 10^{-3}$ M Ca^{++} bis $1,49 \cdot 10^{-4}$ M Ca^{++}) nimmt die Bindung der Calciumionen an RNS bei ansteigenden g-Strophanthinkonzentrationen (10^{-7} M bis 10^{-4} M) gegenüber einer g-Strophanthinfreien Lösung leicht ab.

Bei der Zugabe von 10^{-4} M g-Strophanthin steigt der freie Anteil der Calciumionen für $c = 0,51 \cdot 10^{-3}$ M Ca^{++} von 10,02 % auf 11,12 %. Dieser Unterschied sowie die unter den anderen Bedingungen erhaltenen Unterschiede sind nicht signifikant (Tab. 6).

c) Einfluß von Digitoxin auf die Bindung von Calciumionen an RNS (Abb. 3)

In dem untersuchten Konzentrationsbereich ($0,51 \cdot 10^{-3}$ M Ca^{++} bis $1,49 \cdot 10^{-3}$ M Ca^{++}) und bei ansteigenden Digitoxinkonzentrationen (10^{-7} M bis 10^{-4} M) nimmt die Bindung der Calciumionen an RNS gegenüber einer Digitoxin-freien Lösung leicht zu.

Bei der Zugabe von z.B. 10^{-4} M Digitoxin sinkt der freie Anteil der Calciumionen für $c = 0,51 \cdot 10^{-3}$ M Ca^{++} von 10,02 % auf 8,81 %. Dieser Unterschied wie alle anderen unter Digitoxin gefundenen Unterschiede sind statistisch nicht signifikant (Tab. 6).

d) Einfluß von Digitoxigenin auf die Bindung von Calciumionen an RNS (Abb. 4)

In dem untersuchten Konzentrationsbereich ($0,51 \cdot 10^{-3}$ M Ca^{++} bis $1,49 \cdot 10^{-3}$ M Ca^{++}) nimmt die Bindung der Calciumionen an RNS bei ansteigenden Digitoxigeninkonzentrationen (10^{-7} M bis 10^{-4} M) gegenüber einer Digitoxigenin-freien Lösung ab.

Bei der Zugabe von 10^{-4} M Digitoxigenin steigt der freie Anteil α der Calciumionen für $c = 0,51 \cdot 10^{-3}$ M Ca^{++} von 10,02 % auf 11,01 %. Dieser Unterschied wie alle anderen unter Digitoxigenin gefundenen Unterschiede sind statistisch nicht signifikant (Tab. 6).

e) Einfluß von BG 32 auf die Bindung von Calciumionen an RNS (Abb. 5)

In dem untersuchten Konzentrationsbereich ($0,51 \cdot 10^{-3}$ M Ca^{++} bis $1,49 \cdot 10^{-3}$ M Ca^{++}) nimmt die Bindung der Calciumionen an RNS bei ansteigenden BG 32-Konzentrationen (10^{-7} M bis 10^{-4} M) gegenüber einer BG-32-freien Lösung ab.

Die Zugabe von BG 32 ruft in allen Konzentrationen eine Zunahme des freien Anteils α der Calciumionen hervor. Diese Unterschiede sind signifikant (Tab. 6).

Die Abb. 6 - 9 stellen die Abhängigkeit des prozentualen Anteils an freien Calciumionen von einer vorgegebenen Calciumionenkonzentration und von den variierten Substanzkonzentrationen dar.

Bei jeder der vorgegebenen Gesamtcalciumkonzentration $c = 0,51$ bis $1,49 \cdot 10^{-3}$ M Ca^{++} ergibt sich für BG 32 eine signifikante Erhöhung des freien Anteils α der Calciumionen. g-Strophanthin, Digitoxin und Digitoxigenin führen zu keiner statistisch signifikanten Erhöhung des α -Wertes bei den genannten Calciumgesamtkonzentrationen.

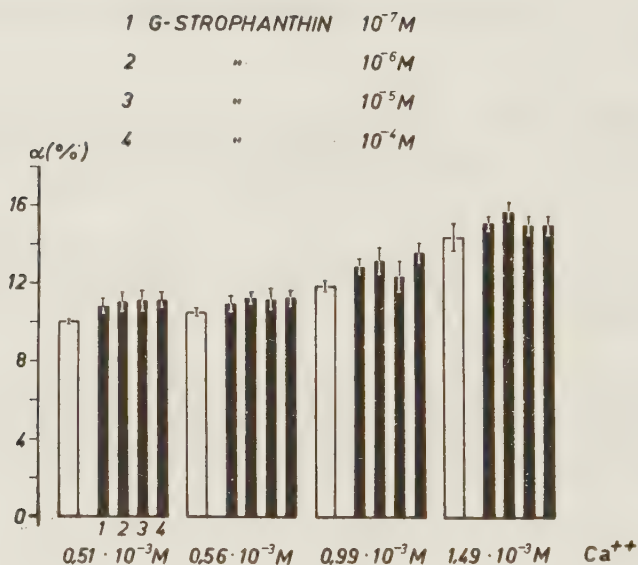


Abb. 2: Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen von der Calciumgesamtkonzentration (weiße Säulen) und unter dem Einfluß steigender g-Strophanthinkonzentrationen (schwarze Säulen). Die Ordinate gibt den freien Anteil α wieder.

Die Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 21 - 23$ (Ca^{++}) und $N = 6$ (g-Strophanthin) Versuchen dar.

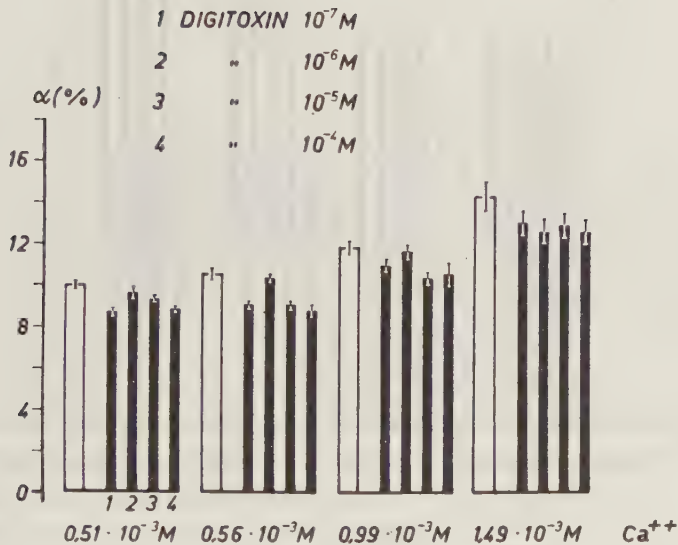


Abb. 3: Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen von der Calciumgesamtkonzentration (weiße Säulen) und unter dem Einfluß steigender Digitoxinkonzentrationen (schwarze Säulen). Die Ordinate gibt den freien Anteil α wieder.

Die Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 21 - 23$ (Ca^{++}) und $N = 6$ (Digitoxin) Versuchen dar.

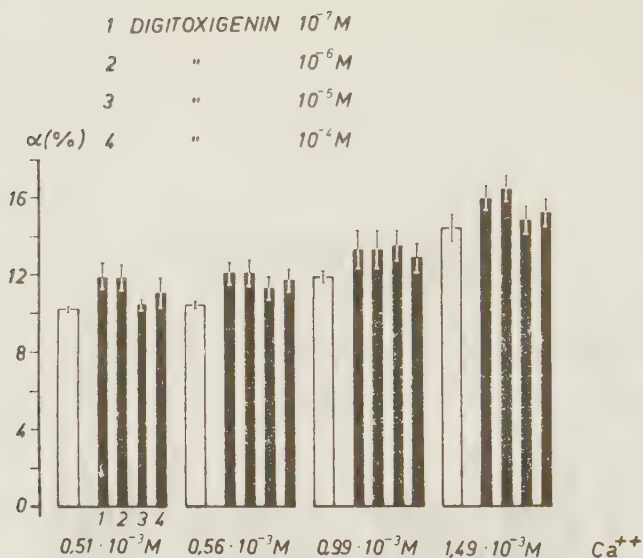


Abb. 4: Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen von der Calciumgesamtkonzentration (weiße Säulen) und unter dem Einfluß steigender Digitoxigeninkonzentrationen (schwarze Säulen). Die Ordinate gibt den freien Anteil α wieder.

Die Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 21 - 23$ (Ca^{++}) und $N = 6$ (Digitoxigenin) Versuchen dar.

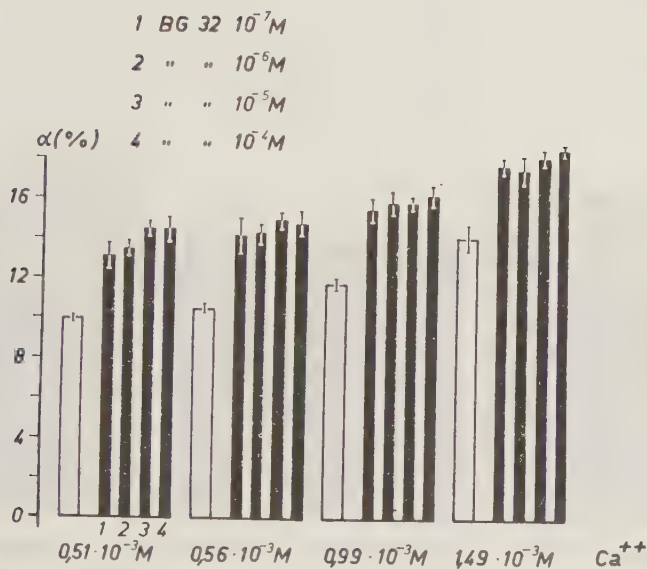


Abb. 5: Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen von der Calciumgesamtkonzentration (weiße Säulen) und unter dem Einfluß steigender BG-32-Konzentrationen (schwarze Säulen). Die Ordinate gibt den freien Anteil α wieder.
 Die Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 21 - 23$ (Ca^{++}) und $N = 6$ (BG-32) Versuchen dar.

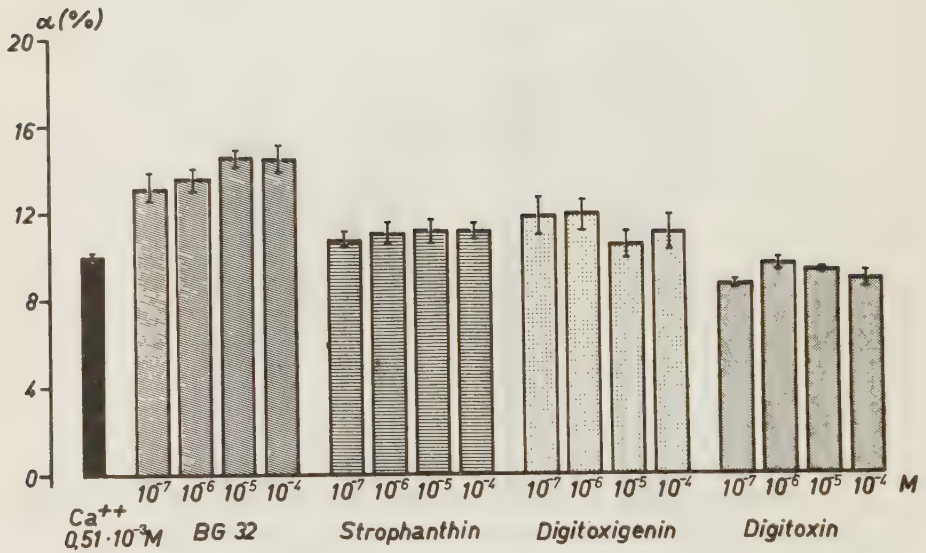


Abb. 6: Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calcium-
ionen (in % auf der Ordinate) von der Gesamtcalcium-
konzentration $c = 0,51 \cdot 10^{-3} \text{ M Ca}^{++}$ (schwarze Säulen)
und unter dem Einfluß variierter Substanzkonzentrationen
(gemusterte Säulen).

Die α -Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 23$ (Ca^{++}) und
 $N = 6 - 9$ (Substanzen) Versuchen dar.

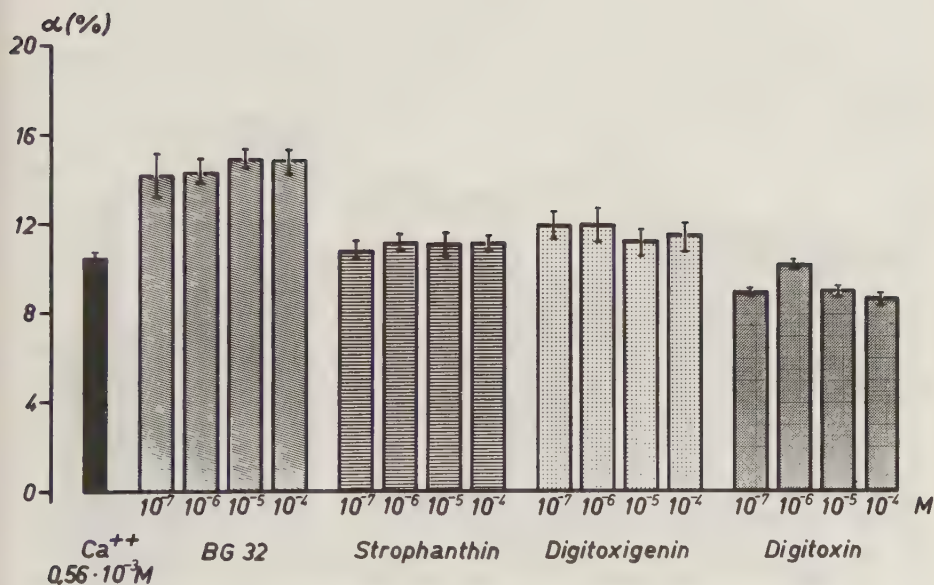


Abb. 7: Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen (in % auf der Ordinate) von der Calciumgesamt-konzentration $c = 0,56 \cdot 10^{-3}$ M Ca⁺⁺ (schwarze Säulen) und unter dem Einfluß variiertter Substanzkonzentrationen (gemusterte Säulen).

Die α -Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 23$ (Ca⁺⁺) und $N = 6 - 9$ (Substanzen) Versuchen dar.

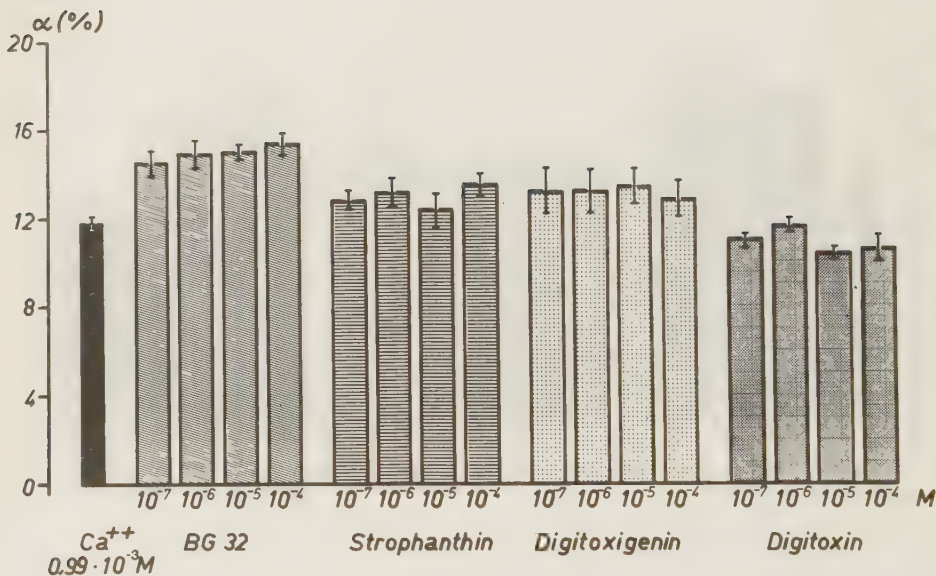


Abb. 8: Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen (in % auf der Ordinate) von der Calciumgesamtkonzentration $c = 0,99 \cdot 10^{-3} \text{ M Ca}^{++}$ (schwarze Säulen) und unter dem Einfluß variierter Substanzkonzentrationen (gemusterte Säulen).

Die α -Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 23$ (Ca^{++}) und $N = 6 - 9$ (Substanzen) Versuchen dar.

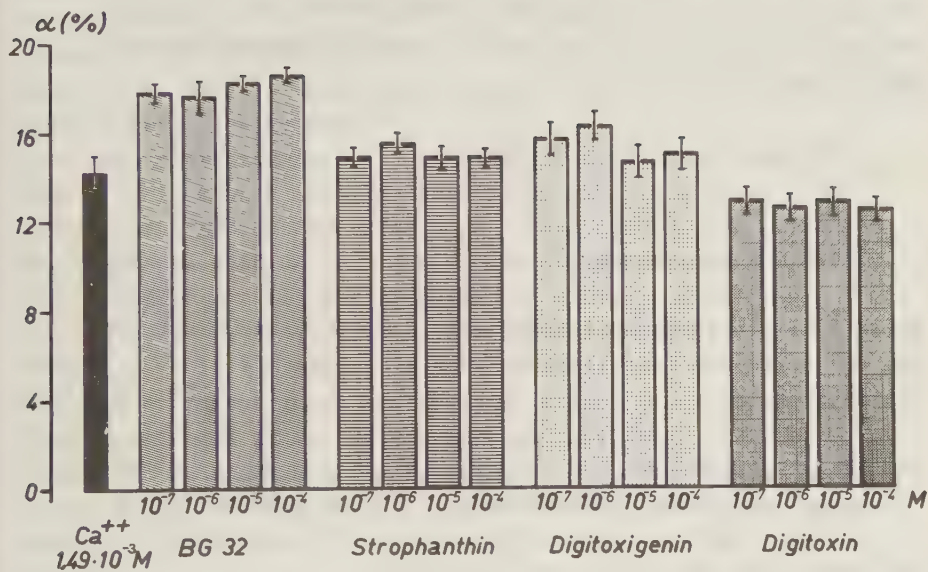


Abb. 9: Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen (in % auf der Ordinate) von der Calciumgesamt-konzentration $c = 1,49 \cdot 10^{-3}$ M Ca⁺⁺ (schwarze Säulen) und unter dem Einfluß variierteter Substanzkonzentrationen (gemusterte Säulen).

Die α -Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 21$ (Ca⁺⁺) und $N = 6 - 9$ (Substanzen) Versuchen dar.

2. Weitere Charakterisierung der Bindung von Calciumionen an RNS

Die Bindung von Calciumionen an RNS läßt sich graphisch nach Scholtan (1962) im doppellogarithmischen Netz wiedergeben. Trägt man die Konzentrationen an freien (Abszisse) und gebundenen (Ordinate) Calciumionen gegeneinander auf, so erhält man eine gerade Linie, die durch folgende Gleichung definiert werden kann (Abb. 10):

$$\log c_g = \log k^+ + m \log c_f$$

$$k^+ = c_g / c_f$$

(k^+, m = Konstanten)

Für die Calciumionen-RNS-Lösung allein sowie unter Zusatz der verschiedenen Substanzen ergeben sich folgende Gleichungen:

Ca^{++} -RNS-Lösung

$$\log c_g = 0,8796 + 0,7441 \cdot \log c_f \quad N = 90; r = 0,99$$

Ca^{++} -RNS-Lösung mit Zusatz von Digitoxin

$$\log c_g = 0,9304 + 0,7749 \cdot \log c_f \quad N = 96; r = 0,99$$

Ca^{++} -RNS-Lösung mit Zusatz von Digitoxigenin

$$\log c_g = 0,8394 + 0,6831 \cdot \log c_f \quad N = 96; r = 0,99$$

Ca^{++} -RNS-Lösung mit Zusatz von g-Strophanthin

$$\log c_g = 0,8500 + 0,6907 \cdot \log c_f \quad N = 96; r = 0,99$$

Ca^{++} -RNS-Lösung mit Zusatz von BG 32

$$\log c_g = 0,7528 + 0,6058 \cdot \log c_f \quad N = 124; r = 0,99$$

N = Anzahl der Versuche; r = Korrelationskoeffizient

Die in dieser sogenannten mittleren Bindungsgeraden auftretende Konstante k^+ bezeichnet die apparente Bindungskonstante. Sie gibt an, wieviel mal größer die Konzentration an gebundener Substanz als die Konzentration an freier Substanz ist.

Für die Bindung von Calciumionen an RNS wurde eine apparente Bindungskonstante k^+ von $7,5 \cdot (10^{-4} \text{ M})^{1-m}$ ermittelt. Die Bindungskonstante wurde ebenfalls für die Versuchsreihen mit den oben angegebenen (II,1) Substanzen bestimmt. Die dabei errechneten Werte sind in Tab. 3 aufgeführt.

Eine der Gesamtbindungskonstanten K_1 proportionale Größe K kann graphisch nach Scholtan (1964) aus Abb. 12 ermittelt werden, wenn man den Quotient c_g/c_f gegen die Konzentration c_g an gebundenem Calcium aufträgt. K ergibt sich dann als Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate ($c_g = 0$). K_1 erhält man, indem die molare Konzentration der verwendeten RNS durch die Größe K dividiert wird.

Aufgrund der nicht genau festlegbaren Krümmung der Kurve sind K und damit auch K_1 nur näherungsweise bestimmbar.

Da das Molekulargewicht der verwendeten RNS unbekannt ist, werden zur Berechnung der Gesamtbindungskonstante K_1 ein angenommenes Molekulargewicht von 100 000 und von 500 000 zugrunde gelegt.

Die ermittelten Werte für die Größen K und K_1 sind in der Tab. 5 für die Wechselwirkung zwischen Calciumionen und 0,5%iger RNS-Lösung sowie unter dem Einfluß der zugesetzten Substanzen wiedergegeben.

Die Gesamtbindungskonstante K_1 kann außerdem nach einer Angabe von Scatchard (1949) berechnet werden (Abb. 13). Trägt man den Quotienten $\bar{r}/c_f$ gegen das spezifische Bindungsvermögen $\bar{r}$ auf, so erhält man die Größe der Gesamtbindungskonstanten K_1 als Ordinatenabschnitt für $\bar{r} = 0$. Da sich bei dieser Darstellung gekrümmte Bindungslinien ergeben, ist die Größe von K_1 nicht genau festlegbar.

Mit derselben Darstellung ist es möglich, die Anzahl n der Bindungsstellen pro RNS-Molekül zu bestimmen. Der Wert von n ergibt sich als Schnittpunkt der Kurven mit der Abszisse. Da die erhaltenen Kurven im hohen Konzentrationsbereich sich parallel zur Abszisse bewegen, liegt die Anzahl n der Bindungsstellen sicherlich höher als 24 bzw. 120 für ein angenommenes Molekulargewicht der RNS von 100 000 bzw. 500 000.

Die Krümmung der Kurven (Abb. 12) macht nach Scholtan (1964) deutlich, daß die bindenden Gruppen der RNS sich voneinander unterscheiden.

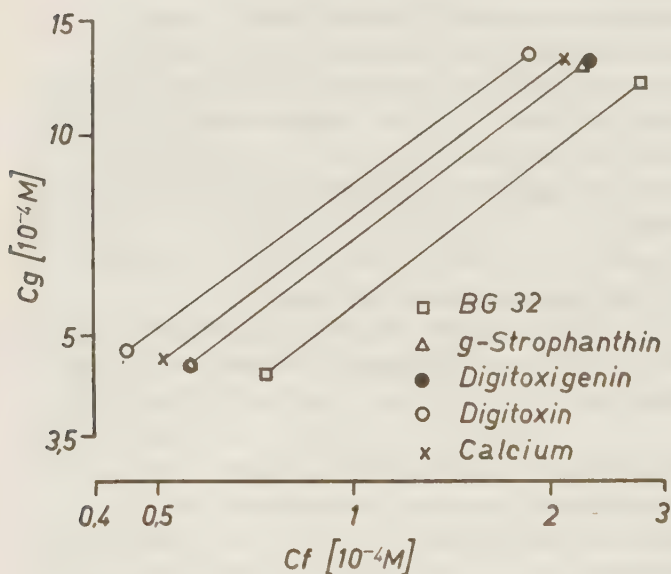


Abb. 10: Wechselwirkung zwischen Calciumchlorid und einer 0,5%igen RNS-Lösung allein sowie unter dem Einfluß von g-Strophanthin, Digitoxin, Digitoxigenin und BG 32 jeweils in Konzentrationen von 10^{-4} M. Darstellung nach Scholtan (1962).

Abhängigkeit der Konzentration c_g an gebundener Substanz (in 10^{-4} M) auf der Ordinate von der Konzentration c_f an freier Substanz (in 10^{-4} M) auf der Abszisse. Die für das doppelt-logarithmische Netz berechneten Gleichungen der Regressionsgeraden finden sich im Text auf Seite 22. Die Punkte an den Regressionsgeraden begrenzen den untersuchten Konzentrationsbereich. Einzelwerte wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen.

Die Abb. 11 stellt die Konzentration-Wirkungsbeziehung einer 0,5%igen RNS-Lösung mit Calciumionen allein und unter dem Zusatz der Konzentrationen der untersuchten Substanzen dar. Die Konzentration-Wirkungsbeziehung wurde berechnet und im doppellogarithmischen Netz aufgetragen:

Es zeigt sich, daß der Anteil Ca^{++} an freien Calciumionen (auf der Ordinate) von der variierten Gesamtcalciumionenkonzentration c (auf der Abszisse) abhängt. Es ergibt sich eine Gerade, die sogenannte mittlere Bindungsgerade.

Die für das doppeltlogarithmische System berechneten Gleichungen der linearen Regressionen ($\log y = \log a + b \cdot \log x$) lauten:

Ca^{++} -RNS-Lösung

$$\log y = 0,5977 + 0,292 \cdot \log x$$

$$N = 90; r = 0,67$$

BG 32

$$\log y = 0,5899 + 0,2257 \cdot \log x$$

$$N = 124; r = 0,707$$

g-Strophanthin

$$\log y = 0,6027 + 0,2953 \cdot \log x$$

$$N = 96; r = 0,809$$

Digitoxin

$$\log y = 0,5995 + 0,3109 \cdot \log x$$

$$N = 96; r = 0,824$$

Digitoxigenin

$$\log y = 0,6003 + 0,2846 \cdot \log x$$

$$N = 96; r = 0,665$$

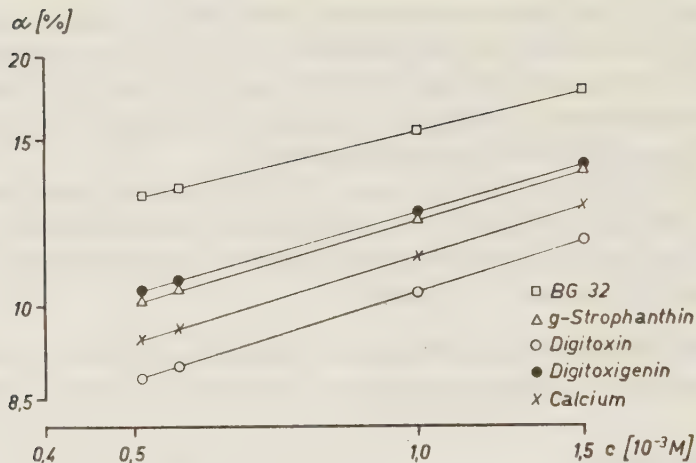


Abb. 11: Konzentration-Wirkungsbeziehung einer 0,5%igen RNS-Lösung mit Calciumchlorid allein und unter dem Zusatz der untersuchten BG 32-, g-Strophanthin-, Digitoxin- und Digitoxigenin-Konzentrationen.

Abhängigkeit des Anteils α an freier Substanz (in % auf der Ordinate) von der Gesamtcalciumionenkonzentration c (in 10^{-3} M auf der Abszisse).

Die für das doppeltlogarithmische System berechneten Gleichungen der linearen Regressionen finden sich im Text auf Seite 25.

Die Punkte an den Regressionsgeraden begrenzen den untersuchten Konzentrationsbereich.

Einzelwerte wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen.

$\log y$ = Anteil α an freier Substanz (in %, Ordinate)
 $\log x$ = Gesamtcalciumionenkonzentration c (in 10^{-3} M, Abszisse)

Die Abhängigkeit der Konzentration-Wirkungsbeziehung von dem Zusatz der verschiedenen untersuchten Substanzen macht sich bemerkbar in einer Verschiebung der mittleren Bindungsgeraden gegeneinander. Die Erhöhung der Wirkung, deutlich im angestiegenen α -Wert, bleibt somit im Verhältnis der zugegebenen Substanzen nahezu gleich. Eine signifikante Abweichung der Parallelität der mittleren Bindungsgeraden, als lineare Funktionen der Konzentration-Wirkungsbeziehung ($\log y = \log a + b \log x$), ergibt sich nur für den Vergleich zwischen dem Zusatz von BG 32 zur Ca^{++} -RNS-Lösung und demjenigen von g-Strophanthin zur Ca^{++} -RNS-Lösung sowie für den Vergleich zwischen der Behandlung mit BG 32 und Digitoxin. Die Steigung der mittleren Bindungsgeraden, ausgedrückt in der Steigungskonstanten b (Abb. 11 und Tab. 4) ist in allen Fällen kleiner als 1.

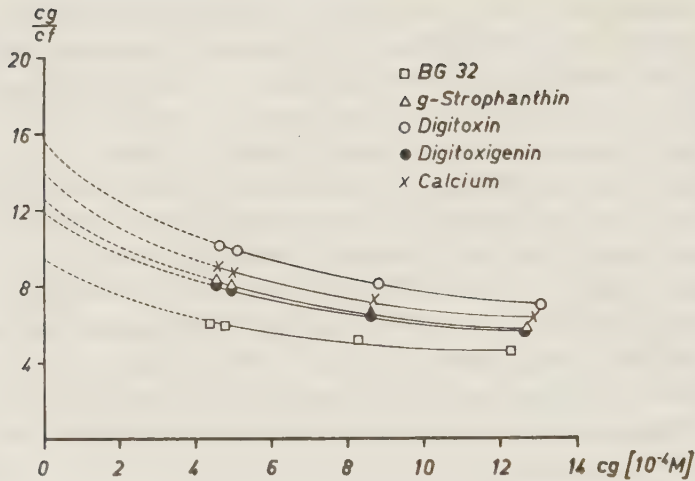


Abb. 12: Bindungsvermögen einer 0,5%igen RNS-Lösung mit Calciumionenzusatz und in Anwesenheit der untersuchten Substanzkonzentrationen (Digitoxin, Digitoxigenin, g-Strophanthin, BG 32).

Abhängigkeit des Quotienten c_g/c_f (Ordinate) von der Konzentration c_g (in $10^{-4} M$, Abszisse) an gebundenen Calciumionen.

Die Punkte stellen in der Abbildung arithmetische Mittelwerte dar ($N = 96 - 124$).

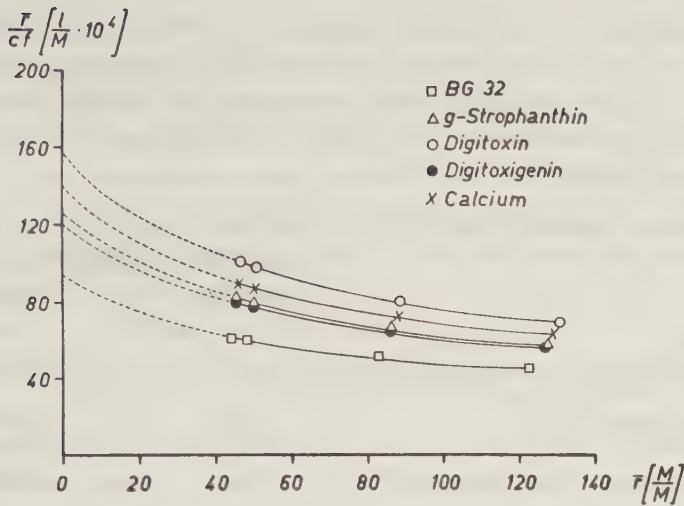


Abb. 13: Bindungsvermögen einer 0,5%igen RNS-Lösung mit Calciumionenzusatz und in Anwesenheit der untersuchten Substanzkonzentrationen (Digitoxin, Digitoxigenin, g-Strophanthin, BG 32).

Abhängigkeit des Quotienten $\bar{r}/c_f$ (10^4 1/M) auf der Ordinate von dem spezifischen Bindungsvermögen $\bar{r}$ (M/M) auf der Abszisse (Darstellung nach Scatchard, 1949).

Angenommenes RNS-Molekulargewicht: 500 000.

Die Punkte in der Abbildung stellen arithmetische Mittelwerte dar (N = 96 - 124).

Tab. 3: Apparente Bindungskonstante k^+ und Steigungskonstante m für die Wechselwirkung zwischen Calciumionen mit einer 0,5%igen Hefe-RNS-Lösung und unter dem Einfluß der untersuchten Konzentrationen von Digitoxin, Digitoxigenin, g-Strophanthin und BG 32.

Lösungen	Berechnete Konstanten für	
	Bindung $k^+ (10^{-4} \text{ M})^{1-m}$	Steigung m
Ca^{++} -RNS-Lösung	7,58	0,7441
Ca^{++} -RNS-Lösung + g-Strophanthin	7,08	0,6907
Ca^{++} -RNS-Lösung + Digitoxin	8,52	0,7749
Ca^{++} -RNS-Lösung + Digitoxigenin	6,91	0,6831
Ca^{++} -RNS-Lösung + BG 32	5,66	0,6058

Tab. 4: Statistische Maßzahlen für die Konzentration-Wirkungsbeziehung einer 0,5%igen RNS-Lösung mit Calciumchlorid allein und unter dem Zusatz der untersuchten Substanzen (Digitoxin, Digitoxigenin, g-Strophanthin, BG 32)-Konzentrationen.

Lineare Regressionen: $\log y = \log a + b \cdot \log x$
 Angegeben sind die Steigung b, der Streckenabschnitt a, der Korrelationskoeffizient r, die Vertrauensgrenze von 95 % für den Korrelationskoeffizienten r, das Bestimmtheitsmaß B und die Anzahl N der Versuche für die lineare Regressionsgeraden.

Lösungen	Maßzahlen aus dem Regressionsansatz					
	b	a	r	95 %	B	N
Ca ⁺⁺ -RNS-Lösung	0,292	3,96	0,67	0,53-0,77	0,44	90
Ca ⁺⁺ -RNS-Lösung + g-Strophanthin	0,295	4,01	0,81	0,71-0,87	0,65	96
Ca ⁺⁺ -RNS-Lösung + Digitoxin	0,311	3,98	0,82	0,75-0,88	0,68	96
Ca ⁺⁺ -RNS-Lösung + Digitoxigenin	0,284	3,98	0,82	0,53-0,76	0,44	96
Ca ⁺⁺ -RNS-Lösung + BG 32	0,225	3,89	0,71	0,61-0,79	0,50	124

Tab. 5: Gesamtbindungskonstante K_1 und die der Gesamtbindungskonstanten K_1 proportionale Größe K für die Wechselwirkung zwischen Calciumionen und einer 0,5%igen Hefe-RNS-Lösung sowie unter dem Einfluß von Digitoxin, Digitoxigenin, g-Strophanthin und BG 32.

Angenommenes Molekulargewicht der RNS von 100 000 bzw. 500 000.

Lösungen	K	Bindungskonstanten	
		$K_1 (10^4 \text{ L/M})$ für MG der RNS von	
		100 000	500 000
Ca^{++} -RNS-Lösung	$\sim 14,0$	~ 28	~ 140
Ca^{++} -RNS-Lösung + g-Strophanthin	$\sim 12,6$	$\sim 25,2$	~ 126
Ca^{++} -RNS-Lösung + Digitoxin	$\sim 15,6$	$\sim 31,2$	~ 156
Ca^{++} -RNS-Lösung + Digitoxigenin	$\sim 11,9$	$\sim 23,8$	~ 119
Ca^{++} -RNS-Lösung + BG 32	$\sim 9,45$	$\sim 18,9$	~ 94

Tab. 6 a: Varianzanalysentabelle der durchgeführten Versuche

Versuch mit Ca-Konzentration	Art der Streuung	Zahl der Frei- heitsgrade	Mittleres Abweichungs- quadrat MAQ	F-Wert	Signifikanz
$c = 0,51 \cdot 10^{-3} \text{ M Ca}^{++}$	Zwischen den Substanzen	29	209 102,4	10,71	++
	Innerhalb der Substanzen	199	19 517,5		
	Insgesamt	228			
$c = 0,56 \cdot 10^{-3} \text{ M Ca}^{++}$	Zwischen den Substanzen	29	252 794,2	9,29	++
	Innerhalb der Substanzen	198	27 216,3		
	Insgesamt	227			
$c = 0,99 \cdot 10^{-3} \text{ M Ca}^{++}$	Zwischen den Substanzen	29	280 265,2	8,49	++
	Innerhalb der Substanzen	198	33 022,2		
	Insgesamt	227			

Fortsetzung - Tab. 6 a: Varianzanalysetabelle der durchgeführten Versuche

Versuch mit Ca-Konzentration	Art der Streuung	Zahl der Frei- heitsgrade	Mittleres Abweichungs- quadrat MAQ	F-Wert	Signifikanz
c = $1,49 \cdot 10^{-3}$ M Ca ⁺⁺	Zwischen den Substanzen	29	257 623,8	6,39	++
	Innerhalb der Substanzen	197	40 305,3		
	Insgesamt	226			

Tabelle 6 b: Test nach Dunnett im Anschluß an die Varianzanalyse. Vergleiche von Lösungen mit Substanzzusatz gegen reine Ca-RNS-Lösung ohne Zusatz. Kontrollgruppe ist die Gesamtcalciumkonzentration c. Prüfwerte sind die steigenden Konzentrationen von g-Strophanthin, Digitoxin, Digitoxigenin und BG 32.

Ca ⁺⁺ -RNS-Lösung Konzentration in 10 ⁻³ M	Anzahl der Versuche	Mittel- wert $\bar{x}_{Ca}$	Substanz Bezeichnung	Konzen- tration	Anzahl der Versuche	Mittel- wert $\bar{x}_Z$	Mittelwerts- Beurteilung differenz $\bar{x}_Z - \bar{x}_{Ca}$
0,51	23	10,02	g-Strophanthin	10 ⁻⁷ M	6	10,77	0,75
				10 ⁻⁶ M	6	11,00	0,98
				10 ⁻⁵ M	6	11,13	1,11
				10 ⁻⁴ M	6	11,12	1,10
			Digitoxin	10 ⁻⁷ M	6	8,66	-1,36
				10 ⁻⁶ M	6	9,57	-0,45
			Digitoxigenin	10 ⁻⁵ M	6	9,26	-0,76
				10 ⁻⁴ M	6	8,81	-1,21
				10 ⁻⁷ M	6	11,78	1,76
				10 ⁻⁶ M	6	11,84	1,82
				10 ⁻⁵ M	6	10,45	0,43
				10 ⁻⁴ M	6	11,01	0,99

Tabelle 6 b - Fortsetzung -

Ca ⁺⁺ -RNS-Lösung	Substanz	Anzahl der Versuche	Mittel- wert $\bar{x}_{Ca}$	Bezeichnung	Konzen- tration	Anzahl der Versuche	Mittel- wert $\bar{x}_Z$	Mittelwerts- differenz $\bar{x}_Z - \bar{x}_{Ca}$	Beurteilung
10 ⁻³ M									
0,51	BG 32	23	10,02		10 ⁻⁷ M	6	13,12	3,10	++
					10 ⁻⁶ M	7	13,55	3,53	++
					10 ⁻⁵ M	9	14,52	4,49	++
					10 ⁻⁴ M	9	14,49	4,47	++
0,56	g-Strophanthin	23	10,47		10 ⁻⁷ M	6	10,87	0,40	
					10 ⁻⁶ M	6	11,17	0,70	
					10 ⁻⁵ M	6	11,15	0,68	
					10 ⁻⁴ M	6	11,18	0,71	
					10 ⁻⁷ M	6	9,02	-1,45	
	Digitoxin				10 ⁻⁶ M	6	10,29	-0,18	
					10 ⁻⁵ M	6	9,06	-1,41	
					10 ⁻⁴ M	6	8,70	-1,77	
	Digitoxigenin				10 ⁻⁷ M	6	12,02	1,55	
					10 ⁻⁶ M	6	12,05	1,58	
					10 ⁻⁵ M	6	11,24	0,77	
					10 ⁻⁴ M	6	11,52	1,05	

Tabelle 6 b - Fortsetzung -

Ca ⁺⁺ -RNS-Lösung Konzentration in 10 ⁻³ M	Anzahl der Versuche	Mittel- wert $\bar{x}_{Ca}$	Substanz Bezeichnung	Konzen- tration	Anzahl der Versuche	Mittel- wert $\bar{x}_Z$	Mittelwerts- differenz $\bar{x}_Z - \bar{x}_{Ca}$	Beurteilung
0,99	23	11,84	BG 32	10 ⁻⁷ M	6	14,19	3,72	++
				10 ⁻⁶ M	7	14,36	3,89	++
				10 ⁻⁵ M	9	14,96	4,49	++
				10 ⁻⁴ M	9	14,86	4,39	++
				10 ⁻⁷ M	6	12,78	0,94	
0,99	23	11,84	g-Strophanthin	10 ⁻⁶ M	6	13,15	1,31	
				10 ⁻⁵ M	6	12,31	0,47	
				10 ⁻⁴ M	6	13,47	1,63	
				10 ⁻⁷ M	6	10,93	-0,91	
				10 ⁻⁶ M	6	11,59	-0,25	
0,99	23	11,84	Digitoxin	10 ⁻⁵ M	6	10,34	-1,50	
				10 ⁻⁴ M	6	10,53	-1,31	
				10 ⁻⁷ M	6	13,17	1,27	
				10 ⁻⁶ M	6	13,18	1,28	
				10 ⁻⁵ M	6	13,39	1,55	
0,99	23	11,84	Digitoxigenin	10 ⁻⁴ M	6	12,80	0,96	

Tabelle 6 b - Fortsetzung -

Ca ⁺⁺ -RNS-Lösung Konzentration in 10 ⁻³ M	Substanz Bezeichnung	Anzahl der Versuche	Mittel- wert $\bar{x}_{Ca}$	Konzen- tration	Anzahl der Versuche	Mittel- wert $\bar{x}_Z$	Mittelwerts- differenz $\bar{x}_Z - \bar{x}_{Ca}$	Beurteilung
1,49	BG 32			10 ⁻⁷ M	6	15,49	3,65	++
				10 ⁻⁶ M	7	15,92	4,08	++
				10 ⁻⁵ M	9	15,97	4,13	++
				10 ⁻⁴ M	9	16,34	4,50	++
	g-Strophanthin	21	14,27	10 ⁻⁷ M	6	14,95	0,68	
				10 ⁻⁶ M	6	15,60	1,33	
				10 ⁻⁵ M	6	14,91	0,64	
				10 ⁻⁴ M	6	14,93	0,66	
				10 ⁻⁷ M	6	12,97	-1,30	
				10 ⁻⁶ M	6	12,63	-1,64	
				10 ⁻⁵ M	6	12,90	-1,37	
				10 ⁻⁴ M	6	12,58	-1,69	
	Digitoxigenin			10 ⁻⁷ M	6	15,81	1,54	
				10 ⁻⁶ M	6	16,38	2,11	
				10 ⁻⁵ M	6	14,77	0,50	
				10 ⁻⁴ M	6	15,12	0,85	

Tabelle 6 b - Fortsetzung -

Ca ⁺⁺ -RNS-Lösung Konzentration in 10 ⁻³ M	Substanz		Konzen- tration	Anzahl der Versuche	Mittel- wert $\bar{x}_{Ca}$	Mittel- wert $\bar{x}_Z$	Mittelwerts- differenz $\bar{x}_Z - \bar{x}_{Ca}$	Beurteilung
	Anzahl der Versuche	Bezeichnung						
1,49	21	BG 32	10 ⁻⁷ M	6	14,27	17,84	3,57	++
			10 ⁻⁶ M	7		17,65	3,38	++
			10 ⁻⁵ M	9		18,21	3,94	++
			10 ⁻⁴ M	9		18,68	4,41	++

IV. Diskussion

Die verwendete Hefe-RNS besteht aus hoch- und niedermolekularen Anteilen. Die letzteren würden sich bei Gleichgewichtsdialyse störend bemerkbar machen und die Ergebnisse der Bindungsversuche verfälschen. Aus den Versuchen von Riechert und Wollert (1971 a) ist ersichtlich, daß durch eine Vordialyse die niedermolekularen Anteile der Hefe-RNS entfernt werden können. Es entsteht eine für Gleichgewichtsdialyse brauchbare, überwiegend hochmolekulare Hefe-RNS. Die genannten Autoren fanden nach einer Vordialyse von 4 Tagen im Puffer 2 bis 2,5 % niedermolekulare RNS-Bruchstücke von der RNS-Gesamtkonzentration. Dieser geringe Anteil könnte in der Lage sein, die α -Werte zu verändern. Für die in Tabelle 2 angegebenen α -Werte sind daher niedrigere Werte anzunehmen.

Zur Bestimmung der Wechselbeziehung zwischen niedermolekularen Substanzen und RNS (Riechert und Wollert, 1971 a,b; Martynus, 1973) wurde die von Krieglstein und Kuschinsky (1968) angegebene Methode der Gleichgewichtsdialyse verwendet.

In dem untersuchten Konzentrationsbereich zwischen $0,51 \cdot 10^{-3}$ M und $1,49 \cdot 10^{-3}$ M liegen die α -Werte für die Bindung von Calciumionen an Ribonukleinsäure zwischen 10 und 14 Prozent. Das bedeutet, daß Calciumionen in hohem Ausmaß, bis zu 90 Prozent, an Ribonukleinsäure gebunden werden. Die starke Bindung der Calciumionen an Ribonukleinsäure kommt in den Werten der apparenten Bindungskonstanten $K_1 = 1,4 \cdot 10^6$ (L/M) und der der Gesamtbindungskonstanten proportionalen Größe $K = 14,0$ zum Ausdruck.

Aus den Abbildungen 3 bis 10 ist ersichtlich, daß eine Abhängigkeit der Bindung von der Gesamtkonzentration der Calciumionen nur in geringem Maße vorhanden ist. Der α -Wert nimmt mit ansteigender Calciumionenkonzentration leicht, aber nicht signifikant (Tab. 6) zu.

Die Darstellung der Versuchsergebnisse für die Bindung von Calciumionen an Ribonukleinsäure nach Scatchard (1949) ergab gekrümmte Linien (Abb. 12), so daß man mindestens zwei Sätze

bindender Gruppen von unterschiedlicher Affinität annehmen muß. Die gleiche Darstellung erlaubt Angaben über die Anzahl n der Bindungsstellen am RNS-Molekül. Durch den fast parallelen Verlauf der Kurve mit der Abszisse ist die Zahl der Bindungsstellen nicht genau festlegbar, so daß diese Werte (Schnittpunkt der Kurve mit der Abszisse) für Calciumionen höher liegen als die angegebenen von $n = 24$ für ein RNS-Molekulargewicht von 100 000 bzw. $n = 120$ für ein solches von 500 000. Klotz und Ayers (1953) wiesen bei Untersuchungen über die Bindung von Kationen und Anionen an Serumalbumin darauf hin, daß durch eine Zunahme der Substanzkonzentration weitere Bindungsstellen frei werden bzw. die Affinität der bindenden Gruppen zunimmt. Derselbe Effekt könnte über eine Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur der RNS eine höhere Zahl an Bindungsstellen bewirken (Riechert und Wollert, 1971a).

Klaus und Lee (1969) führten die Wirkung der Herzglykoside auf die Kontraktionskraft des Herzmuskels auf eine Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen den verschiedenen cellulären Calciumfraktionen zurück. Gerber et al. (1968) schlossen auf eine Bedeutung der Mikrosomenfraktion, in der Digitoxin angereichert wird, für die positiv inotrope Wirkung dieses Pharmakons. Chipperfield und Nayler (1969) konnten eine subcelluläre Verschiebung des Calciums bei Gabe von g-Strophanthin feststellen.

In unseren Versuchen werden die α -Werte der Calciumionen durch Zusatz von Digitoxin, Digitoxigenin und g-Strophanthin nur leicht erhöht. Es ergibt sich keine signifikante Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration der herzwirksamen Substanzen. Eine Zunahme der freien Calciumionen, wie sie in den Versuchsergebnissen für die Bindung von Calciumionen an RNS zum Ausdruck kommt, besteht weiterhin. Dies läßt darauf schließen, daß diese Substanzen auf die Bindung von Calciumionen an Ribonukleinsäure keinen Einfluß ausüben. Man kann annehmen, daß diese Herzglykoside entweder gar nicht an Ribonukleinsäure oder jedenfalls nicht an den Bindungsstellen der Calciumionen gebunden werden.

Herzglykoside sind also nicht befähigt, Calciumionen aus ihrer Bindung an Ribonukleinsäure zu lösen. Franke (1971) stellte fest, daß Herzglykoside nicht an Ribonukleinsäure im Herzen gebunden werden. Somit kann man ausschließen, daß Ribonukleinsäure für die intracelluläre Calciumverschiebung bei Gabe von Herzglykosiden eine Rolle spielt.

In dem untersuchten Konzentrationsbereich von $0,51 \cdot 10^{-3}$ M bis $1,49 \cdot 10^{-3}$ M Calcium ergibt sich bei Zusatz von BG 32 zur Calciumionen-RNS-Dialyse eine signifikante Erhöhung des Anteils der freien Calciumionen (Abb. 5). Der α -Wert steigt z.B. bei Zugabe von 10^{-7} M BG 32 zu einer $0,51 \cdot 10^{-3}$ M Ca^{++} -Lösung von 10,02 % auf 13,10 %. Diese Erhöhung tritt in allen untersuchten Konzentrationen von BG 32 auf. Martynus (1973, in Vorbereitung) konnte für BG 60 ebenfalls eine signifikante Erhöhung der α -Werte, für BG 31 nur eine solche in hohen Konzentrationsbereichen beobachten.* Die Erhöhung der α -Werte bzw. die Erniedrigung des Anteils an gebundenen Calciumionen weist darauf hin, daß die Bindung von Calciumionen an Ribonukleinsäure durch die Zugabe von BG 32 beeinflusst wird. Für eine Erniedrigung der Bindung sprechen weiterhin die auf $0,94 \cdot 10^6$ (L/M) erniedrigte Gesamtbindungskonstante K_1 für ein angenommenes Molekulargewicht der Ribonukleinsäure von 500 000 und die der Gesamtbindungskonstanten K_1 proportionale Größe K , die auf 14,0 abnimmt.

Riechert und Wollert (1971b) sowie Weinbach (1971) geben für verschiedene Bisguanylhydrazone eine starke Bindung an Ribonukleinsäure an. Sie konnten zeigen, daß diese Bindung durch Zusatz von NaCl bzw. KCl vermindert wird. Martynus (1973) stellte fest, daß divalente Kationen durch Zusatz von Bisguanylhydrazonen von Ribonukleinsäure verdrängt werden. In unseren Versuchen ergab sich bei Zusatz von BG 32 derselbe Effekt. Es läßt sich daher folgern, daß mono- und divalente Kationen sowie Bisguanylhydrazone an denselben Stellen der Ribonukleinsäure gebunden werden.

Die Wechselwirkung von niedermolekularen Substanzen mit Ribonukleinsäure kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Es sind hydrophobe- und Wasserstoffbrückenbindungen von Scholtan (1968) beschrieben worden sowie ionogene Bindungen von Banerjee und Perkins (1962). Choi und Carr (1967) konnten die Annahme von Wiberg und Neumann (1957) bestätigen, wonach divalente Metallionen an die Phosphatgruppen der Ribonukleinsäure, und zwar an die primären, gebunden werden.

Calciumionen, als divalente Metallionen, werden an die Phosphatgruppen der Ribonukleinsäure gebunden. Da Calciumionen durch Bisguanylhydrazone bzw. umgekehrt aus ihren Bindungsstellen an der Ribonukleinsäure verdrängt werden, kann man annehmen, daß die Phosphatgruppen der Ribonukleinsäure auch die Bindungsstellen für Bisguanylhydrazone darstellen. Hofmann und Wollert (1969 a,b) konnten für Bisguanylhydrazone eine lange Verweildauer im Meerschweinchenorganismus nachweisen. Dabei enthielt hauptsächlich die Mikrosomenfraktion, die zum großen Teil aus Ribonukleinsäure und Eiweiß besteht, Bisguanylhydrazone. Bei der starken Bindung der Bisguanylhydrazone an Ribonukleinsäure wäre es vorstellbar, daß für das Verhalten der Bisguanylhydrazone im Organismus auch in vivo diese Bindung von Bedeutung ist.

Die cardiotone Wirkung der Bisguanylhydrazone könnte auf ihre Bindung an Ribonukleinsäure zurückgeführt werden. Durch ihre Bindung an die Phosphatgruppe der Ribonukleinsäure verdrängen sie Calciumionen von deren Bindungsstellen und erhöhen somit deren freien Anteil. Dieses Verhalten der Bisguanylhydrazone steht im Gegensatz zu demjenigen der Herzglykoside, deren Wirkung auf Calciumionen nicht mit Ribonukleinsäure in Verbindung steht.

Die Fähigkeit der Bisguanylhydrazone, Calciumionen aus ihrer Bindung an Ribonukleinsäure freizusetzen und ähnlich den Herzglykosiden, den intracellulären Calciumanteil zu erhöhen, könnte für die cardiotone Wirkung dieser Pharmaka bedeutungsvoll sein.

V Zusammenfassung

Die Substanzen g-Strophanthin, Digitoxin und Digitoxigenin sowie das herzoglykosidartig wirkende Bisguanylhydrazon BG 32 würden auf ihren Einfluß auf die Bindung von Calciumionen an Ribonukleinsäure untersucht.

Die Wechselwirkung zwischen Calciumchlorid und Ribonukleinsäure wurde durch folgende Größen beschrieben: der prozentuale Anteil α an freier Substanz, die apparente Bindungskonstante k^+ und die Steigungskonstante m , außerdem die Gesamtbindungskonstante K_1 , die ihr proportionale Größe K und die Anzahl n der Bindungsstellen pro RNS-Molekül. Diese Größen wurden beschrieben mit und ohne Zusatz der Substanzen. Für die Berechnung von K , K_1 und m wurde ein Molekulargewicht der Ribonukleinsäure von 100 000 bzw. 500 000 zugrunde gelegt.

Der Anteil an freien Calciumionen bei der Bindung von Calciumchlorid an Ribonukleinsäure nahm mit steigender CaCl_2 -Konzentration zu.

In den untersuchten Konzentrationsbereichen ergab sich nach BG 32 eine signifikante Erhöhung der α -Werte mit steigender Konzentration. Die Pharmaka g-Strophanthin, Digitoxin und Digitoxigenin führen nicht zu einem signifikanten Anstieg der α -Werte.

Es wird gefolgert, daß Ribonukleinsäure keine Bedeutung für die Erhöhung des intracellulären Calciumionenanteils durch Herzglykoside besitzt. Im Gegensatz dazu könnte Ribonukleinsäure eine Rolle bei der Erhöhung des intracellulären Calciumanteils durch Bisguanylhydrazone spielen und somit die cardiotone Wirkung dieser Pharmaka mit bedingen.

VI. Literaturverzeichnis

Banerjee, K.C. and D.J. Perkins:

The interactions of some metal ions with desoxyribonucleic and ribonucleic acids in aqueous solution.

Biochemica et Biophysica Acta (Amst.) 61, 1-6 (1962)

Chipperfield, D. and W.G. Nayler:

The effect of ouabain on calcium in subcellular fractions of cardiac muscle.

J.Pharmacolog.exp.Ther. 170, 311-317 (1969)

Choi, Y.S. and C.W. Carr:

Ion-binding studies of ribonucleic acid and escherichia coli ribosomes.

J.Mol.Biol. 25, 331-345 (1967)

Dransfeld, H., E. Galetke und K. Greef:

Die Wirkung des Prednisolonbisguanylhydrazons auf die Na^+ - und K^+ -aktivierte Membran-ATPase des Herz- und Skelettmuskels.

Arch.int.Pharmacodyn.Ther. 166₂, 342-349 (1967)

Dutta, S., S. Goswami, J.O. Lindower and B.H. Marks:

Subcellular distribution of digoxin- H^3 in isolated guinea pig and rat hearts.

J.Pharmacol.exp.Ther. 159, 324-334 (1968)

Franke, J.:

Zur Isolierung von Ribonukleinsäure aus dem Kalbsherzen und über die Bindung von Herzglykosiden an diese kardiale RNS.
Dissertation, Mainz (1971)

Gerber, H.-G., U.Fricke, W.Klaus und U.Wollert:

Ober die intracelluläre Verteilung von ^3H -Digitoxin im Meerschweinchenherzen.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 260, 119-120 (1968)

Harrison, C.E., Jr., R.O.Brandenburg, P.A.Ongley, A.L.Orvis, and C.A.Owen, Jr.:

The distribution and excretion of tritiated substances in experimental animals following the administration of digoxin- ^3H .

J.Lab.clin.Med. 67, 764-777 (1966)

von Hattingberg, H.M., W.Klaus, H.Lüllmann und S.Zepf:

Fluorometrische Bestimmung von Mikromengen Calcium in Muskelgewebe.

Experientia (Basel) 22, 553-555 (1966)

Hofmann, P. und U. Wollert:

Die Verteilung des Progesteron-3,20-bisguanylhydrazon und des Dodecandion-2,11-bisguanylhydrazon im Meerschweinchen-organismus.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 262, 484-494 (1969a)

Hofmann P. und U. Wollert:

Die Verteilung des herzoglykosidartig wirkenden 3,3'-Dimethyl-4,4'-diacetyldiphenylbisguanylhydrazon im Meerschweinchen-organismus.

Arzneimittel-Forschung 19, 1845-1849 (1969b)

Klaus, W. and K.S. Lee:

Influence of cardiac glycosides on calcium binding in muscle subcellular components.

Journal of pharmacology and experimental therapeutics 166, 68-76 (1969)

Klaus, W. und H. Lüllmann:

Calcium als intracelluläre Überträgersubstanz und die mögliche Bedeutung dieses Mechanismus für pharmakologische Wirkungen.

Klinische Wochenschrift 42, 253-259 (1964)

Klotz, J.M. and J. Ayers:

Protein interactions with organic molecules.

Discuss.Faraday Soc. 13, 189-196 (1953)

Koller, S.:

Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen.

4. Auflage, Steinkopff Verlag Darmstadt (1969)

Krieglstein, J. und G. Kuschinsky:

Quantitative Bestimmung der Eiweißbindung von Pharmaka durch Gelfiltration.

Arzneimittelforschung (Drug Res.) 18, 287-289 (1968)

Kroneberg, G., K.H.Meyer, E.Schrautstätter, S. Schütz und K. Stoepel:

Synthetische Verbindungen mit Digitaliswirkung.

Naturwissenschaften 51, 192 (1964)

Kroneberg, G. und K. Stoepel:

Synthetische Verbindungen mit Digitaliswirkung.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak.

249, 393-415 (1964)

Lee, K.S. and S.J. Choi:

Effects of the cardiac glycosides on the Ca^{++} -uptake of cardiac sarcoplasmic reticulum.

Journal of pharmacology and experimental therapeutics 153, 114-120 (1966)

Lin, R. I-San and O.A.Schjeide:

Micro estimation of RNA by the cupric ion catalysed
orcinol reaction.

Analyt.Biochem. 27, 473-483 (1969)

Miller, Jr., R.G.:

Many-one t statistics.

in: Simultaneous statistical inference.

Mc Graw-Hill Book Company New York, p. 76-81 (1966)

Martynus, V.:

Dissertation in Vorbereitung, Mainz (1973)

Repke, K.:

Verteilung, Ausscheidung und Stoffwechsel von Digitoxin bei
der Ratte.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak.

233, 271-283 (1958)

Repke, K.:

Über den biochemischen Wirkungsmodus von Digitalis.

Klinische Wochenschrift 42, 157-165 (1964)

Riechert, M. und U. Wollert:

Über die Wechselwirkung herzwirksamer Substanzen mit
Ribonukleinsäure.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. 268, 148-160 (1971 a)

Riechert, M. und U. Wollert:

The influence of mono- and divalent cations on the binding
of small cationic molecules to ribonucleic acid (Der Ein-
fluß mono- und divalenter Kationen auf die Bindung nieder-
molekularer kationischer Substanzen an RNS).

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. 270, R 114 (1971 b)

Scatchard, G.:

The attractions of proteins for small molecules and ions.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672 (1949)

Scholtan, W.:

Ober die Bindung der Langzeitsulfonamide an die Serum-eiweißkörper.

Makromolek. Chemie 54, 24-59 (1962)

Scholtan, W.:

Die Bindung der Antibiotika an die Eiweißkörper des Serums.

3. Mitteilung

Arzneimittelforschung (Drug Res.) 13, 347 (1963)

Scholtan, W.:

Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.

4. Mitteilung

Arzneimittelforschung (Drug Res.) 14, 1139-1146 (1964)

Scholtan, W.:

Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin und Ribonukleinsäure.

Arzneimittelforschung (Drug Res.) 18, 505-517 (1968)

Scholtan, W. und J. Schmid:

Die Bindung der Penicilline an die Eiweißkörper des Serums und des Gewebes.

Arzneimittelforschung (Drug. Res.) 12, 741-750 (1962)

Weinbach, W.Ch.:

Charakterisierung der Wechselwirkung aliphatischer Bisguanylhydrazone mit Ribonukleinsäure.

Dissertation, Mainz (1971)

Wiberg, J.S. and W.F. Neuman:

The binding of bivalent metals by desoxyribonucleic and ribonucleic acid.

Arch.Biochem.Biophys. 72, 66-83 (1957)

Wollert, U.:

Pharmakologische Eigenschaften von Mono- und Bisguanylhydrazonen.

Arzneimittelforschung (Drug. Res.) 19, 680-683 (1969)

Mein Dank gilt Fräulein W. Krauss und Frau K. Lemmel,
die mir bei der Durchführung der Versuche behilflich waren
sowie Frau H. Steinbrunn, die die Photographien anfertigte.

Lebenslauf

Am 25. Januar 1943 wurde ich als erstes Kind des Stadtbaumeisters Walter Rose und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Henke, in Bad Polzin/Pommern geboren. Die Flucht 1945 brachte mich über Berlin und Geestacht an der Elbe nach Langenberg/Rhld. Hier wurde ich Ostern 1949 eingeschult. Nach vier Jahren wechselte ich auf das dortige Neusprachliche Gymnasium, das ich am 18.2.1964 mit dem Zeugnis der Reife verließ.

An der Technischen Universität Berlin studierte ich zunächst zwei Semester Bauingenieurwissenschaften. Im Wintersemester 1965/66 begann ich das Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich am 8.4.1967, die ärztliche Vorprüfung am 25.3.1969. Das Studium der Medizin schloß ich am 6.12.1972 mit der ärztlichen Prüfung ab.

Vom 15.1. bis 15.4.1973 arbeitete ich am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz. Vom 1.5.1973 bis zum 31.9.1973 war ich als Medizinalassistent im DRK-Krankenhaus Mainz tätig.

Die restliche MA-Zeit verbrachte ich im Rochuskrankenhaus Mainz-Mombach auf der chirurgischen Abteilung, beginnend vom 1.11.1973. Dort war ich bis zu meiner Bundeswehreinberufung am 6.5.1974 tätig.

